



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ADIÇÃO DE MONÔMERO COM FUNÇÃO QUATERNÁRIA DE AMÔNIO EM ADESIVOS
EXPERIMENTAIS PARA COLAGEM DE BRÁQUETES METÁLICOS:
DESENVOLVIMENTO DE LESÃO CARIOSA E RESISTÊNCIA DE UNIÃO APÓS DESAFIO
CARIOGÊNICO

Aracaju
Janeiro / 2016



Patrícia Layane de Menezes Macêdo Nascimento

ADIÇÃO DE MONÔMERO COM FUNÇÃO QUATERNÁRIA DE AMÔNIO EM ADESIVOS
EXPERIMENTAIS PARA COLAGEM DE BRÁQUETES METÁLICOS:
DESENVOLVIMENTO DE LESÃO CARIOSAS E RESISTÊNCIA DE UNIÃO APÓS DESAFIO
CARIOGÊNICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Faria e Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto

Aracaju
Janeiro / 2016

DEDICATÓRIA

Primeiramente, à Deus!

À minha família,

meu filho João Gabriel e meu esposo Daniel,

meus pais Araribóia e Rejane, meu irmão Igor Rodrigo,

meu porto seguro!

Dedico o meu esforço,

a minha gratidão,

o meu amor!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que nunca tirou de mim seu olhar de amor. Concede-me saúde e coragem para superar momentos difíceis.

À **minha família**, que conseguiu essa conquista comigo. Agradeço por me apoiarem nas decisões pessoais e profissionais. Agradeço, principalmente, a **meu pai Araribóia** por me incentivar a cursar o mestrado. Agradeço a **minha mãe Rejane** por abdicar de suas atividades para me acompanhar até Pelotas/RS com meu filho João Gabriel, onde passei um tempo para realização da pesquisa. Agradeço ao **meu marido Daniel** pelo companheirismo e carinho, e ao **meu filho João Gabriel**, que mesmo tão pequeno, compreendeu minha ausência. Vocês aceitaram dividir o espaço e o tempo com meu computador, artigos e dicionários de língua inglesa.

Ao meu orientador **professor Dr. André Luís Faria e Silva**, pelo norteio durante esses dois anos que tanto colaborou para o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço imensamente o acompanhamento, que mesmo distante, foi feito com muito esmero e dedicação. O senhor com toda certeza é um exemplo de responsabilidade e competência deste Programa de Pós-graduação e merece a admiração e respeito de todos. Assim como agradeço ao meu co-orientador o **professor Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto**, pela prontidão e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À Universidade Federal de Pelotas, pela disponibilidade da estrutura laboratorial e do seu corpo docente e discente que foram essenciais para realização desta pesquisa. Especialmente aos professores **Fabricio Ogliari** e **Maximiliano Cenci** e as doutorandas **Tamires Maske** e **Carine Meereis** que me auxiliaram em todas as etapas desde a laboratorial até a redação desta dissertação. Sem dúvida alguma, vocês tornaram a condução deste trabalho mais leve e fantástica. Obrigada por tudo mesmo, pela paciência, pelo apoio, pelo consolo e incentivo quando algo dava errado, pela disponibilidade em me acompanhar nos finais de semana ou altas horas da noite na faculdade. Agradeço imensuravelmente.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos no transcorrer do curso.

Aos meus colegas de turma pela boa convivência e bons momentos, especialmente **Micaelle** e **Savil**, pela troca de conhecimento, pela paciência e pelo auxílio durante essa etapa acadêmica.

Aos professores do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, pelas experiências compartilhadas e conhecimentos transmitidos.

EPÍGRAFE

“A imaginação é mais importante que o conhecimento.

*Porque enquanto o conhecimento define
tudo o que sabemos e entendemos atualmente,
a imaginação aponta para
tudo o que ainda podemos descobrir e criar”.*

Albert Einstein

RESUMO

Lesões cariosas incipientes, manifestadas por meio de manchas brancas, são comumente visualizadas ao redor dos bráquetes. Além destas lesões poderem progredir para cavidades, uma redução na resistência de união do bráquete ao esmalte dental pode ocorrer devido à perda mineral. Sistemas adesivos contendo monômeros que inibem a adesão ou atividade bacteriana têm sido desenvolvidos para auxiliar no controle de cárie ao redor dos bráquetes. Este estudo avaliou a inibição de cárie e a resistência de união alcançado pela adição do monômero antibacteriano [2 - (metacriloxi) etil] trimetil cloreto de amônio (MADQUAT) ao adesivo usado para colagem de bráquetes ortodônticos quando submetidos ao desafio cariogênico. Para isto, foram utilizados trinta pré-molares hígidos, seccionados ao meio. Bráquetes foram colados nas faces vestibular e lingual usando adesivos experimentais com 0% (controle), 5% ou 10% de MADQUAT. Metade das amostras foram submetidas ao desafio cariogênico em modelo de biofilme com microcosmos, com exposição intermitente a sacarose por 6 horas por dia, durante 5 dias. Em seguida, as amostras foram embutidas em cilindros de resina e os bráquetes submetidos ao carregamento de cisalhamento até ruptura. O padrão de falha foi analisado em microscopia óptica. As amostras ensaiadas foram seccionadas ao meio e a dureza interna do esmalte mensurada para calcular a perda mineral integrada (ΔS). Os dados de resistência de união e ΔS foram submetidos à ANOVA de duas vias e teste de Tukey, enquanto o teste Qui-quadrado foi usado para avaliar o efeito dos fatores no padrão de falha ($\alpha = 0,05$). O adesivo contendo 10% de MADQUAT reduziu significativamente a desmineralização ao redor do bráquete, porém alcançou menores valores de resistência de união. Nenhum efeito na resistência de união e na ΔS foi observado com a adição de 5% de MADQUAT ao adesivo. O desafio cariogênico não afetou a resistência de união e o padrão de falha, o qual foi influenciado pelo adesivo. Concluiu-se que o MADQUAT apenas foi eficaz na redução da desmineralização quando adicionado ao adesivo para uma concentração de 10%, mas esta concentração também reduziu a resistência de união.

Palavras-chave: Adesivo; Atividade antibacteriana; Cárie Dentária; Braquetes ortodônticos

ABSTRACT

Incipient carious lesions manifested by white spots are frequently visualized around the orthodontic brackets. Further to possible progression of these lesions to cavities, a reduction on the bond strength of the bracket to the tooth enamel might occur due to mineral loss. Adhesive systems containing monomers that inhibits the bacteria adhesion or activity have been developed to help at caries control around of brackets. This study evaluated the caries inhibition and shear bond strength reached by addition of antibacterial monomer 2-(Methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (MADQUAT) to adhesive used to cement orthodontic brackets when submitted to cariogenic challenge. Sound premolars were sectioned in halves and brackets are cemented to the buccal and lingual surfaces using experimental adhesives with 0 (control), 5 or 10% of MADQUAT. Half of the samples was subjected to cariogenic challenge using a microcosm biofilm model with intermittent exposure to sucrose for 6 hours per day during 5 days. Following, the samples were embedded in resin cylinders and brackets submitted to shear loading until the de-bonding. The mode failure was analyzed under optical microscopy. The tested samples were sectioned and the internal enamel hardness measured to calculate the integrated mineral loss (ΔS). Data of bond strength and ΔS were submitted to two-way ANOVA and Tukey test, while the chi-square test was used to assess the effect of factors on failure mode ($\alpha = 0.05$). The adhesive containing 10% of MADQUAT significantly reduced the demineralization around the bracket, but also reached lowest bond strength values. No effect on the bond strength and ΔS was observed by addition of 5% MADQUAT to adhesive. The cariogenic challenge did not affect the bond strength and the failure mode, which was influenced only by the adhesive. It was concluded that the MADQUAT was only effective to reduce demineralization when added to the adhesive at a concentration of 10%, whereas this concentration also reduced the bond strength.

Keywords: Adhesive; Antibacterial activity; Dental Caries; Orthodontic Brackets.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivo	2
2.1 Objetivo Específico	2
3. Metodologia	3
3.1 Estudo Piloto	3
3.2 Delineamento experimental	6
3.3 Seleção e preparo dos dentes	6
3.3.1 Manipulação dos adesivos experimentais	7
3.4 Colagem dos bráquetes	7
3.5 Desafio cariogênico	8
3.6 Ensaio de cisalhamento	10
3.7 Análise do Padrão de falha	11
3.8 Análise de dureza da seção transversal das amostras	12
3.9 Análise estatística	13
4. Resultados	14
5. Considerações finais	32
6. Comunicado de imprensa (PRESS RELEASE)	33
Referências	34
Anexo A – Aprovação do comitê de ética	36
Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	38

1 INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento de técnicas adesivas, os bráquetes ortodônticos passaram a ser fixados ao esmalte dental ao invés de serem soldados a bandas metálicas, o que favorecia o desenvolvimento de lesões cariosas (1). Todavia, mesmo nos procedimentos de colagem adesiva dos acessórios ortodônticos usando sistemas adesivos, lesões cariosas incipientes, manifestada por meio da presença de manchas brancas, que podem ser visualizadas ao redor dos bráquetes (2). Além de estas lesões incipientes poderem progredir para cavitações, uma redução na resistência de união do bráquete ao esmalte dental também pode ocorrer sob desafio cariogênico (3). Considerando que o ortodontista necessita aplicar determinada força num grupo de dentes sem que o bráquete descole durante o período de tratamento, a inibição do desenvolvimento de lesões cariosas em volta deste é importante para o sucesso do tratamento, além de contribuir para a manutenção da saúde oral do paciente.

A utilização de sistemas de união com ação antimicrobiana pode auxiliar na redução da descalcificação do esmalte (2), contribuindo para o sucesso do tratamento ortodôntico e na manutenção da higidez do elemento dental. Estudos recentes têm avaliado a efetividade de sistemas adesivos com ação antimicrobiana na inibição do desenvolvimento de lesões cariosas (4-7). Dentre substâncias com potencial para inibição bacteriana, os monômeros quaternários de amônio, que são agentes catiônicos e atuam na ligação com a carga negativa da parede bacteriana (8), podem ter potencial para incorporação em sistemas adesivos. Recentemente, mostrou-se que a adição do [2 - (metacriloxi) etil] trimetil cloreto de amônio ou triazina foi efetiva na redução do acúmulo de biofilme em materiais protéticos (9, 10). Considerando o potencial de monômeros com função quaternária de amônio como agente antimicrobiano, o seu uso em sistemas adesivos para colagem de bráquetes ortodônticos pode favorecer a inibição de lesões cariosas e a manutenção da união. Para avaliação da eficácia das substâncias antimicrobianas nos materiais adesivos, tem sido proposto métodos de indução de cárie com modelos de biofilme por meio de culturas originadas a partir de microcosmos utilizando-se saliva humana (11, 12).

A incorporação de substâncias antimicrobianas aos materiais de uso odontológico tem sido enfatizada. O uso destes agentes inseridos na composição dos sistemas adesivos usados na colagem de bráquetes pode levar a inibição do desenvolvimento de lesões incipientes de cárie. Todavia, uma possível redução na resistência de união ocasionada por estes agentes, pode comprometer o sucesso do tratamento ortodôntico. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de derivados de compostos quaternários de amônio a adesivos experimentais, utilizados na colagem de bráquetes ortodônticos, sobre a resistência de união destes bráquetes, antes e após desafio cariogênico, e no desenvolvimento de lesões cariosas ao redor da colagem.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito antimicrobiano da incorporação de monômeros funcionais quaternários de amônio ao adesivo para colagem de bráquetes no desenvolvimento de lesões cáries próximas à interface e na resistência de união de bráquetes ao esmalte dental.

2.1 Específicos

- Avaliar a perda mineral em torno e sob bráquetes ortodônticos cimentados com adesivos com diferentes concentrações de monômeros com função quaternária de amônio;
- Avaliar o efeito do desafio cariogênico na resistência de união dos sistemas adesivos ao esmalte;
- Comparar resistência de união obtida com sistemas adesivos experimentais com diferentes concentrações de monômeros quaternários de amônio.
- Comparar o padrão de falha após carregamento de cisalhamento aplicado sobre o bráquete.

3 METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa através da Plataforma Brasil e da instituição proponente - Universidade Federal de Sergipe) sob número de protocolo CAAE: 43229115.1.0000.5546 (Anexo A).

3.1 *Estudo Piloto*

Foi realizado um estudo prévio para avaliar o efeito antibacteriano, através do teste de contato direto e a resistência de união. Para isto, adicionou-se o monômero quaternário de amônio [2 - (metacriloxi) etil] trimetil cloreto de amônio (MADQUAT) ou 2-[3-2H-benzotriazol-2-il)-4-hidroxifenil]etil (BTZ) a um adesivo de um sistema condicionante de 2 passos nas concentrações de 0% (controle), 5%; 7,5% ou 10%. Para o teste de contato direto, os adesivos experimentais (10µl) foram aplicados aos micropoços de placas de 96-poços e fotoativados. O adesivo base manipulado sem nenhuma adição de outro monômero, e o adesivo do sistema Clearfil Protect Bond (Kuraray Co., Osaka, Japão), com composição similar ao adesivo base mas com o monômero antibacteriano brometo de metacriloiloxidodecilmiridínio (MDPB) na composição, foram também avaliados, enquanto que o meio sem nenhum adesivo, contendo somente MADQUAT ou BTZ foi usado como controle. Adicionou-se 10µl de suspensão microbiana BHI (*Brain-heart infusion*) com *Streptococcus mutans* nos poços e armazenou-se as placas em anaerobiose (37°C) por 24h. Após esse tempo, 240µl de BHI foram adicionados sobre cada micropoço e o efeito antimicrobiano determinado através da contagem de UFC/ml em BHI ágar (Figura 1).

Para avaliação da resistência de união, a superfície do esmalte de premolares humanos foi condicionada com ácido fosfórico 37% (15 s), seguido pela aplicação e fotoativação (30 s) do adesivo. Cilindros de resina foram construídos com auxílio de uma matriz de silicone sobre o esmalte hibridizado (área de união de 1,5 mm²). Após 24h os cilindros foram submetidos ao teste de resistência de união ao microcisalhamento em uma máquina de ensaios mecânicos (DL 1000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil). O adesivo Clearfil Protect Bond não foi avaliado no teste de união. Os dados do teste de contato direto e de resistência de união foram submetidos a ANOVA uma via e teste de Fisher LSD ($\alpha = 0,05$).

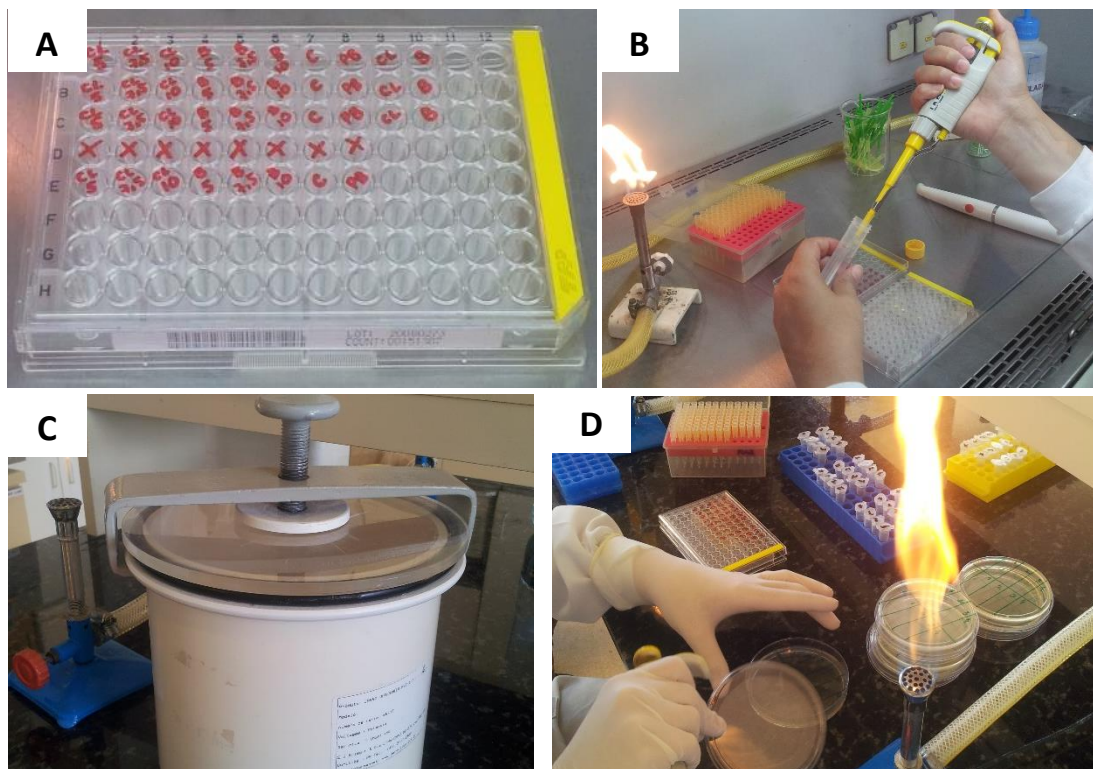


Figura 1. A) Placas de 96-poços; B) Adição de suspensão microbiana aos micropoços contendo adesivos experimentais fotopolimerizados; C) Jarra de anaerobiose; e D) Dispersão da solução em BHI ágar.

Os resultados de efeito antibacteriano estão descritos no Gráfico 1. Todos os adesivos reduziram a contagem bacteriana em relação ao controle. A adição de MADQUAT a 5% ou de BTZ em todas as concentrações, não modificou o efeito antibacteriano do Clearfil SE Bond. Já o MADQUAT reduziu a contagem bacteriana quando adicionado em 7,5% ou 10%, não diferindo do Clearfil Protect Bond. Os resultados de resistência de união estão no Gráfico 2. A adição de MADQUAT a 7,5% ou 10%, e de BTZ a 10% reduziram a resistência de união do Clearfil SE Bond. Baseado nestes resultados, optou-se por utilizar no estudo, o monômero MADQUAT nas concentrações de 5% e 10%.

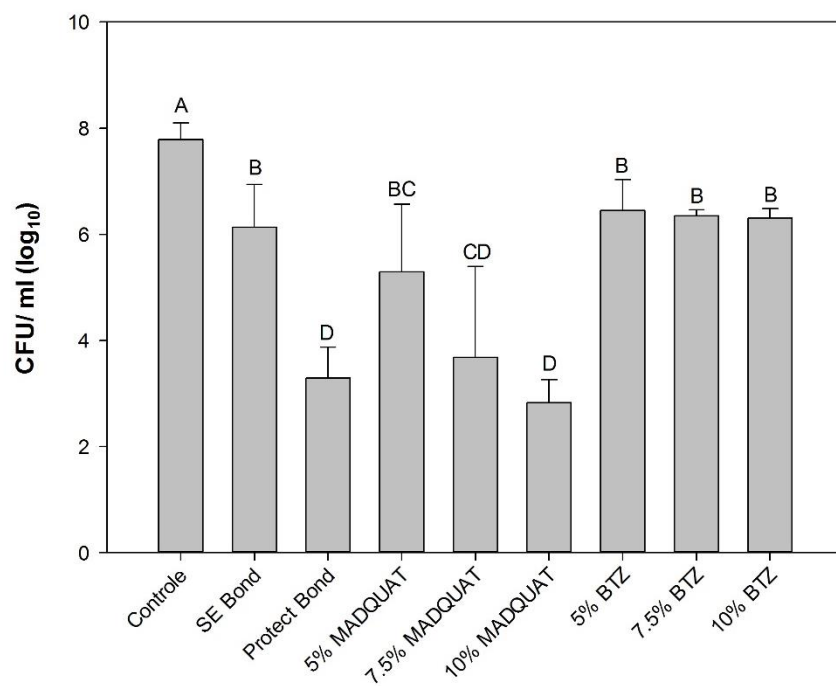


Gráfico 1. Resultado antibacteriano. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

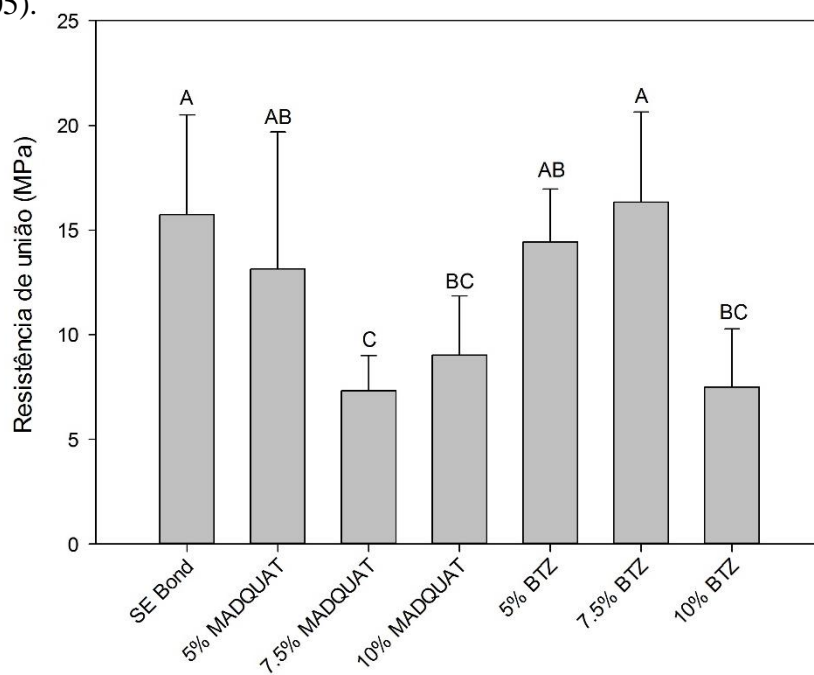


Gráfico 2. Resultado do ensaio de resistência de união. Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

3.2 Delineamento experimental

Este estudo teve um desenho fatorial, sendo os fatores “sistema adesivo”, em 3 níveis, e “desafio cariogênico”, em 2 níveis conforme Figura 2. As variáveis resposta foram resistência de união ao teste de cisalhamento, expressa em MPa, e perda mineral integrada (ΔS), calculada a partir do teste de dureza Knoop.

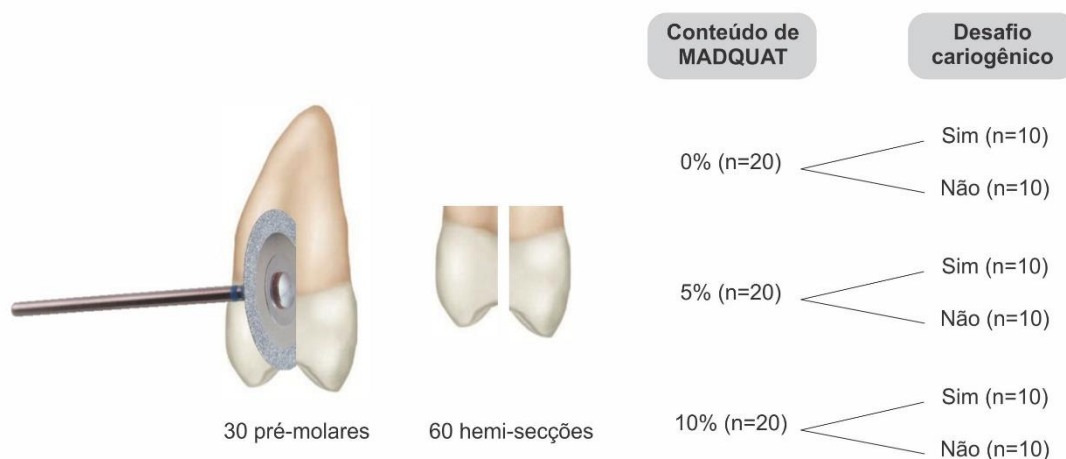


Figura 2. Desenho experimental

3.3 Seleção e preparo dos dentes

Para a realização deste estudo *in vitro*, trinta premolares humanos, hígidos e livres de fissuras, foram armazenados em água destilada até o uso sob temperatura de 4°C para serem utilizados neste trabalho. Para limpeza, a superfície externa das raízes recebeu raspagem com instrumentos periodontais Duflex (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e a coroa foi limpa com taça de borracha (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) associada à pasta de pedra pomes/água (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), seguida de abundante lavagem com água destilada.

A coroa foi separada da raiz através de um corte acima da junção amelocementária através de uma secção com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil), em baixa rotação, sob refrigeração. Em seguida, as coroas foram seccionadas e utilizadas a face vestibular e lingual do dente para colagem do bráquete com sistemas adesivos experimentais.

3.3.1 Manipulação dos adesivos experimentais

O adesivo base foi preparada através da mistura dos monômeros Bisfenol-A glicidil metacrilato (BisGMA; Esstech Inc., Essington, PA, EUA) e hidroxí etil metacrilato (HEMA; Esstech Inc., Essington, PA, EUA), na proporção de 60/40 em peso, tendo como sistema iniciador canforoquinona (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) a 0,4% e 4-dimetilamino benzoato (EDAB; Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) a 0,8%, com Butilhidroxitolueno (BHT; Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) a 0.01% como inibidor e 1% de hexafluorofosfato de difeniliodônio (DPIHFP, Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) . A esta formulação base foi adicionada o monômero quaternário de amônio MADQUAT (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, EUA) na concentração de 5 ou 10%, enquanto que adesivo sem MADQUAT foi usado como controle. A resina adesiva foi solubilizada em etanol a 30% (em peso) e a mistura foi homogeneizada em agitador Vortex (Biomixer QL-901, Biomol Equipamentos e Produtos Para Laboratórios, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 30 minutos. O preparo das resinas adesivas está ilustrado na Figura 3.

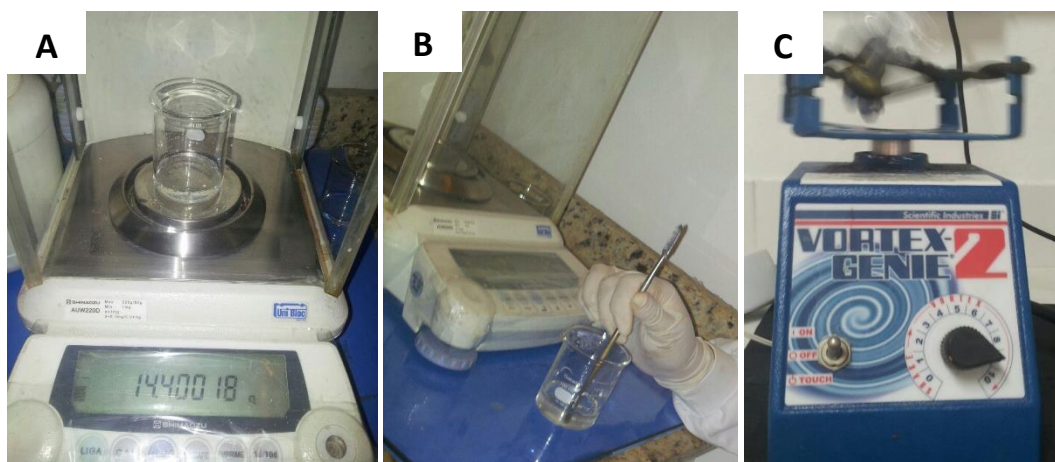


Figura 3. A) Dosagem das substâncias em balança de precisão; B) Homogeneização manual; e C) Agitador.

3.4 Colagem dos bráquetes

O esmalte foi condicionado por 20 segundos com ácido fosfórico a 34% (Condicionador ácido, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil). Em seguida, o ácido foi removido com jato de ar/água pelo mesmo tempo de condicionamento. O substrato foi seco com jato de ar abundante e o adesivo aplicado e polimerizado. Foram usados 60

bráquetes ortodônticos de aço inoxidável para premolares (Área da base: 12,57,Ormco, Glendora, California, EUA). Para o procedimento de colagem, a resina composta Transbond XT (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicada na base dos bráquetes, que foram pressionados manualmente sobre os dentes e os excessos de resina removidos com sonda exploradora. A colagem foi feita na área que possuía maior quantidade de esmalte dental em torno do bráquete. A fotoativação foi realizada por 40 segundos, sendo 10 segundos em cada face do bráquete, com fotopolimerizador a base de LED Rádi Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia) - Figura 4.

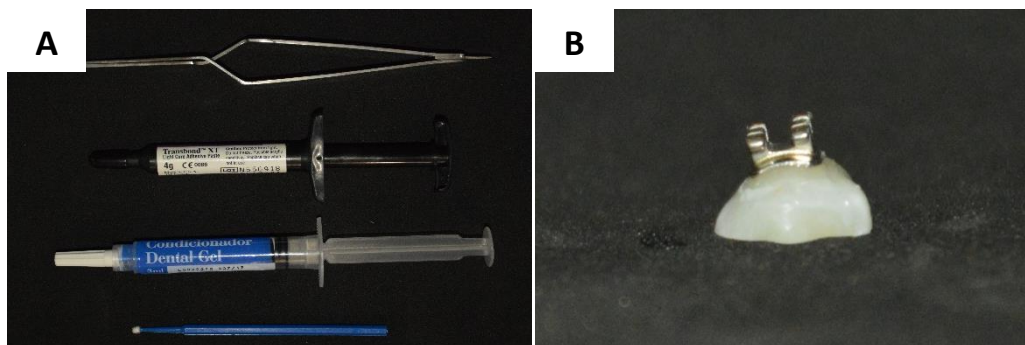


Figura 4. A) Materiais utilizados para colagem; e B) Face vestibular com bráquete colado.

3.5 Desafio cariogênico

Para cada dente, uma das faces em que o bráquete foi colado (lingual ou vestibular) foi submetida a desafio cariogênico, enquanto a outra foi armazenada em água destilada pelo mesmo período do desafio até o momento do teste. A definição de qual face seria submetida ao desafio cariogênico foi feito através de randomização em blocos, sendo o bloco o elemento dental. A randomização foi feita por meio do site www.sealedenvelope.com.

As amostras selecionadas foram armazenadas em tubos Falcon contendo água destilada e esterilizadas por meio de radiação gama na potência de 4.08 Kgy e mantidas à 4°C até o momento de serem utilizadas. A indução do processo de cárie iniciou-se 24 horas após da colagem dos bráquetes. Para isto, biofilmes originados de microcosmos foram crescidos sobre as amostras em condições de anaerobiose, a partir de inóculo de saliva em tubos Falcon, conforme Van de Sande *et al.* (11). A saliva foi coletada de um

doador voluntário saudável, que não recebeu terapia antibiótica por pelo menos 1 ano e se absteve de higiene oral por 24 horas, bem como de alimentação 2 horas previamente à coleta de 20 mL de saliva estimulada por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National CanTM, Chicago, Illinois, EUA). A mesma foi doada após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido para doação, elaborado após aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe (Anexo B).

A saliva (20 mL) estimulada por filme de parafina foi coletada em um tubo estéril graduado e imediatamente homogeneizada em agitador Vortex (Biomixer QL-901, Biomol Equipamentos e Produtos Para Laboratórios, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sendo inoculada em volumes de 400 µL sobre cada amostra de forma individualizada em placas de 96-poços (Figura 5). Para simular os fluidos orais, o meio de cultura definido contendo íons, mucina, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento (DMM) foi utilizado. A obtenção do meio DMM foi realizada conforme protocolo descrito anteriormente por Wong & Sissons (2001), o qual contém mucina gástrica de suíno (2,5 g/l), uréia (1,0 mmol/l), sais (em mmol/l) de: CaCl₂, 1,0; MgCl₂, 0,2; KH₂PO₄, 3,5; K₂HPO₄, 1,5; NaCl, 10,0; KCl, 15,0; NH₄Cl, 2,0, mistura de 21 aminoácidos livres, 17 vitaminas e fatores de crescimento. O meio contém aminoácidos para o equivalente em proteína/peptídeo (em mmol/l) em concentrações baseadas nas da saliva humana: alanina (1,95), arginina (1,30), asparagina (1,73), ácido aspártico (1,52), cisteína (0,05), ácido glutâmico (5,41), glutamina (3,03), glicina (1,95), histidina (1,08), isoleucina (2,38), leucina (3,68), serina (3,46), treonina (1,08), triptofano (0,43), tirosina (2,17), valina (2,38), e caseína (5,0 g/l). A confecção do meio foi realizada com componentes da marca Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, Montana, EUA), exceto pelos sais (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil).

Após 1 hora, 1,8 mL de DMM (meio definido enriquecido com mucina) suplementada com sacarose a 1% foi adicionada em cada micropoço. A placa de 96-poços foi incubada em condição atmosférica de anaerobiose (80% N₂, 10% CO₂ e 10% H₂) em uma jarra de anaerobiose (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), sob temperatura controlada à 37°C e mantidos em repouso na incubadora. Após 6 horas, as amostras foram lavadas em solução salina estéril (10mL) por 5 segundos, recolocadas em novas placas de 96-poços contendo 1,8 mL de saliva artificial (DMM puro) e novamente incubados em anaerobiose à 37°C (Figura 5). Os biofilmes foram

cultivados por 5 dias, sendo feitas trocas de meio duas vezes ao dia, simulando períodos de desafio cariogênico de 6 horas e períodos de remineralização de 18 horas (11).

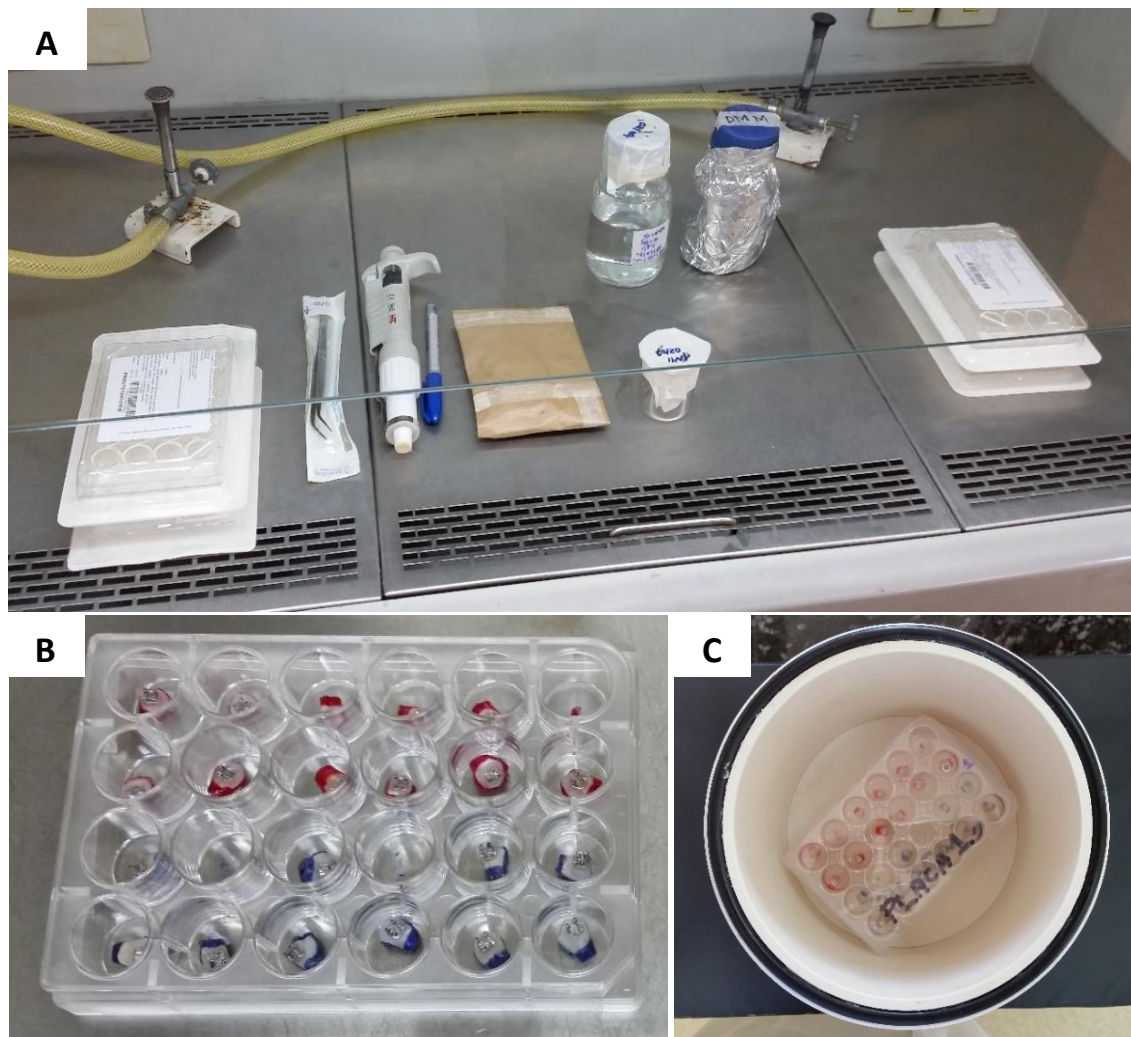


Figura 5. A) Material na estufa para trocas de meio; B) Placas de 96-poços, cada micropoço contendo uma amostra; e C) Placas dentro da jarra de anaerobiose.

3.6 Ensaio de cisalhamento

Todas as amostras, submetidas ou não ao desafio cariogênico, foram incluídas em resina acrílica incolor Class-Mold (Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Para isto, um tubo de PVC com 10 mm de altura e $\frac{3}{4}$ polegada de diâmetro foi posicionado sobre placa de vidro, sendo as margens vedadas com cera rosa número 7. Uma fita de politetrafluoretileno foi posicionada da face onde o bráquete estava colado, protegendo a interface de união. Em seguida, a amostra foi posicionada no centro do tubo, ficando a face vestibular/lingual voltada para a placa. A resina acrílica foi manipulada e vertida no interior do tubo. Após

a presa desta, o cilindro de resina acrílica contendo a amostras foi removido, assim como a fita de politetrafluoretileno, expondo o bráquete.

Os cilindros foram fixados no dispositivo específico para o ensaio de microcisalhamento acoplado a uma máquina de ensaios (DL 1000, EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil). A ponta do cinzel, fixada à célula de carga, foi posicionada na base do bráquete e uma carga de cisalhamento foi aplicada a uma velocidade de 0,5 mm/min, até a ruptura da união – Figura 6A. Os valores de resistência de união, fornecidos em KgF, foram convertidos em MPa através da fórmula: $MPa = KgF * 9,8 / \text{área de união em } mm^2$.

3.7 Análise de Padrão de falha

Após os ensaios de cisalhamento, as amostras foram visualizadas em microscópio óptico com magnificação de 40x para determinação do padrão de falha. Uma adaptação do índice de adesivo remanescente (IAR) foi utilizada para avaliar a quantidade de adesivo sobre o dente após o cisalhamento para determinação do padrão de falha (13). Foi classificado em: Tipo I – Nenhum adesivo recobrindo o esmalte; Tipo II – menos de 50% de adesivo recobrindo o esmalte; Tipo III – mais de 50% de adesivo no esmalte dental (Figura 6B e 6C).

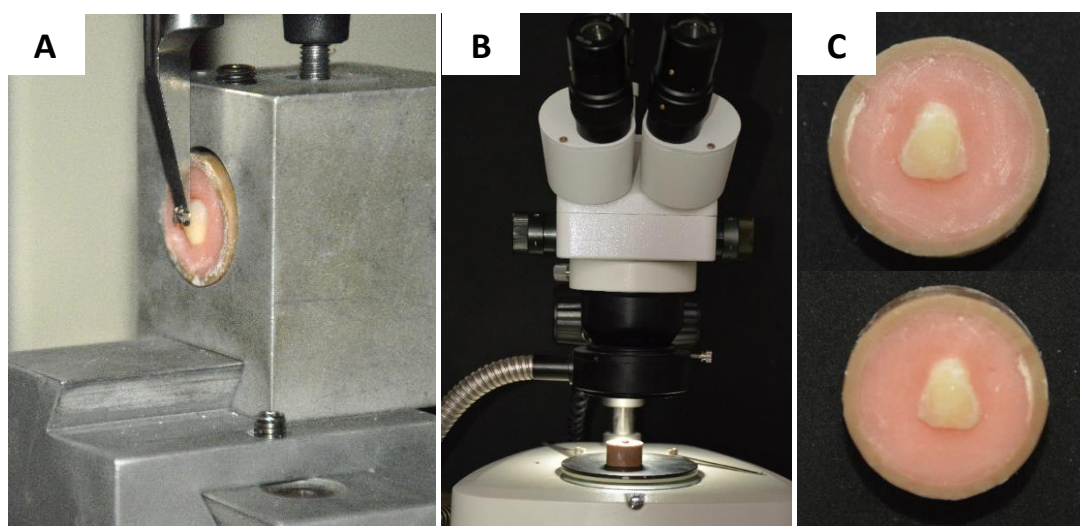


Figura 6. A) Cinzel apoiado na base da interface de união em teste de cisalhamento; B) microscópio óptico; e C) Superfícies dos dentes após o teste de cisalhamento.

3.8 Análise de dureza da seção transversal das amostras

Após a leitura do padrão de falhas, as amostras foram seccionadas ao centro passando pela área de união através de um disco diamantado de alta concentração em cortadeira metalográfica de precisão (Isomet low speed, Bhueler, Lake Bluff, IL, EUA). Os fragmentos foram embutidos novamente em tupos de PVC com resina acrílica (Figuras 7A e 7B). Em seguida, as superfícies internas da secção foram polidas delicadamente com lixas de de carbeto de silício (SiC) #320, #600, #1200, #1500 e #2300 pelo tempo de 30 segundos o uso de cada lixa sendo em seguidas lavadas em cuba de ultrassom com água destilada e secas com jato de ar. Para confirmar a indução de lesões de cárie e mensurar a perda mineral, as amostras foram submetidas ao teste de microdureza Knoop em um microdurômetro HMV-2 (FM-700, Future Tech Corp, Tóquio, Japão) com procedimento automático e aplicação de 25g de carga durante 5 segundos, utilizando um endentador Knoop (Figura 7C). Duas linhas de 8 endentações foram feitas em cada lado da amostra, sendo uma partindo do centro da interface de união e outra na margem desta interface. Em cada linha, as endentações foram feitas nas profundidades de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 e 200 μm . A linha partindo do centro da interface de união será usada como controle de dureza, sendo a iniciada na margem usada para calcular a profundidade de lesão (quando presente). A área integrada de desmineralização (ΔS) foi calculada pela subtração do perfil de dureza nas leituras marginais por aquelas obtidas no centro (dentina hígida) (14). Para determinação do ΔS abaixo do bráquete usou-se como referência a dentina hígida das edentações feitas na região, ou seja, foi considerado um valor como hígido para cada amostra sendo o ΔS decorrente da variação de dureza do próprio material.

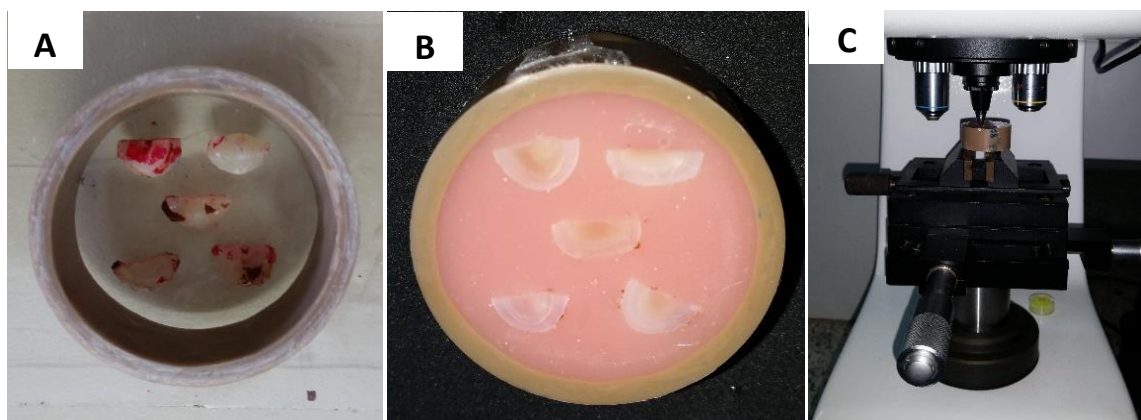


Figura 9. A) Preparo das amostras para leitura; B) Superfícies polidas com lixas de SiC #600; e C) Microdurômetro HMV-2.

3.9 Análise Estatística

Foi utilizado o software estatístico SigmaStat v.3.5. Os dados de resistência de união e perda mineral integrada foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, sendo os fatores em estudo o sistema adesivo e a indução ou não de cárie, seguida pelo teste de Tukey. Os dados de padrão de falha foram submetidos ao teste de Qui-quadrado para os fatores: adesivo e indução de cárie. Para todas as análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Addition of ammonium based methacrylate into experimental dental adhesive for bonding metal brackets: development of carious lesion and bond strength after cariogenic challenge

Patrícia Layane de Menezes Macêdo Nascimento¹; Carine Tais Welter Meereis²; Tamires Timm Maske²; Fabrício Aulo Ogliari²; Maximiliano Sérgio Cenci²; Carmem Silvia Costa Pfeifer³; André Luís Faria-e-Silva¹

1. Graduate Program in Dentistry, Federal University of Sergipe, Rua Cláudio Batista s/n, Aracaju, SE, 49060-100, Brazil.
2. Graduate Program in Dentistry, Federal University of Pelotas, Rua Gonçalves Chaves 457, room 505, Pelotas, RS 96015-560, Brazil.
3. Department of Biomaterials and Biomechanics, Oregon Health & Science University, 2730 SW Moody Ave, Portland, OR, 97201, USA.

*Author to whom correspondence should be addressed.

André Luis Faria-e-Silva. Telephone/Fax: +55 79 2105.1824, e-mail:
fariaesilva.andre@gmail.com

Abstract

This study evaluated the caries inhibition and shear bond strength reached by addition of antibacterial monomer 2-(Methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride (MADQUAT) to an adhesive used to cement orthodontic brackets. Experimental adhesives were formulated with addition of 0 (control), 5 or 10% of MADQUAT and used to lute brackets to enamel of human premolars (n=30). Biofilm from microcosm model was cultivated in half of specimens under cariogenic challenge for 5 days, while the remaining specimens were stored in distilled water for the same time. Brackets were submitted to shear bond strength test followed by failure mode analysis. The fractured specimens were transversally sectioned and the internal hardness of enamel was measured around the brackets to calculate the integrated mineral loss (ΔS). Data of bond strength and ΔS were submitted to 2-way ANOVA and *Tukey's* post hoc test ($\alpha = 0.05$). The effect of cariogenic challenge and adhesive on failure mode was analyzed by Chi-square test. Adhesive containing 10% of MADQUAT significantly reduced the ΔS around the bracket, but also resulted in the lowest values of bond strength. No effect on bond strength and ΔS was observed adding 5% of MADQUAT to adhesive. The cariogenic challenge did not affect the bond strength and the failure mode, which was only influenced by adhesive. In conclusion, MADQUAT was effective to reduce the ΔS only when added to adhesive at concentration of 10% despite the reduction on bond strength.

Keywords: Adhesive; Antibacterial activity; Dental Caries; Orthodontic Brackets.

Introduction

During orthodontic treatment, using brackets cemented to tooth enamel facilitates biofilm accumulation around of bracket, increasing the levels of cariogenic species and the risk for enamel demineralized areas (1-3). This increase biofilm accumulation is due to irregular surfaces of fixed orthodontic appliances, which create areas of stagnation for plaque, hinders the plaque removal and the natural self-cleaning mechanisms (4). Clinically, the incipient caries lesions are visualized as active white spot lesions (WSL). This well-known side effect of orthodontic therapy often causes esthetic problems (5) and, when non treated, the mineral loss increases to enamel cavities, especially in high-risk patients, requiring restorative procedures (6,7). Even when the WSL is properly treated and the lesion is inactivated, the presence of WSL compromising aesthetic can require its removal by micro-abrasion techniques, using infiltrating resin or composite veneer. Furthermore, the demineralization occurs close to bonding interface and can compromise the bond strength of the bracket to the tooth enamel (8). Whereas the orthodontist need to apply certain strength in a group of teeth without the bracket peel off during the orthodontic therapy, inhibiting the development of carious lesions around the orthodontic appliances is critical to successful treatment, and contribute to the oral health of the patient.

Traditionally, adequate amounts of salivary calcium, phosphate, and fluoride ions can promote remineralization and prevent WSL (9,10). It is well established that these ions reduce the rate of demineralization, but ever fluoride preventive strategies might be insufficient on the bacterially produced lower pH conditions (11-13). The use of bonding systems that release antimicrobial agents can help reduce the enamel demineralization, contributing to the success of orthodontic treatment and maintenance of the soundness of the dental element. Recent studies have evaluated the effectiveness of using materials containing antibacterial monomers to be added into dental adhesives (14-17), while the quaternary ammonium monomers have demonstrated be a potential agent to inhibit bacterial activity close to bonding interface (18,19). These monomers are polycationic agents that exhibit activity by the absorption of positively charged polymers into negatively charged cell surfaces of the bacteria and exhibit long-lasting antibacterial activity without compromising the bond strength. Considering the potential of monomers with quaternary ammonium function as an antimicrobial agent, its use in adhesive systems

for cementation of orthodontic brackets may favor the inhibition of carious lesions without compromising the bond strength.

Methods in-situ using tooth fragments inserted into intra-oral appliance are usually used to produce caries-lesion around orthodontics brackets (20). However, due to ethical aspects and difficult to standardize factors related to volunteers, in-vitro models to caries-induction have been used to evaluate the efficacy of antimicrobial substances into adhesives. Among the in-vitro methods, the microcosm models using inoculum from dental plaque or human saliva have demonstrated be efficient to produce standardized lesions with similar characteristics to those observed in-vivo (21). Thus, this study aims to evaluate the effect of addition of ammonium based methacrylate to experimental adhesives used in the cementation of orthodontic brackets on the bond strength of these brackets before and after cariogenic challenge, and the development of carious lesions around the bonding interface. The study hypothesis was that the addition ammonium based methacrylate would reduce the extension of carious lesions around orthodontic brackets without affect its bond strength to enamel.

Material and Methods

Experimental design

This in vitro investigation was conducted using a 2×3 factorial study design to evaluate the factors ‘concentration of ammonium based methacrylate’ in three levels (0, 5 or 10%) and ‘cariogenic challenge’ in two levels (absent or present). Cariogenic challenge was performed using a microcosm biofilm model for 5 days. The bond strength of brackets to enamel was evaluated by shear bond test followed by failure mode analysis (n=10). Specimens used for bond test were sectioned and the internal hardness measured to calculate the integrated demineralization area (ΔS) around the brackets. This study was approved by the local Research Ethics Committee (CAAE # 43229115.1.0000.5546).

Tooth sectioning

Thirty sound human premolars extracted for orthodontic purposes were selected for this study. The teeth presented sound enamel, without wear by attrition, fracture, cracks, restoration, congenital anomalies and structural defects. After extraction, teeth were stored in distilled water at 4 ° C until use. The crowns were separated from roots by sectioning about 2 mm apically from the cemento-enamel junction with double-sided

diamond disc (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil), at low speed, under refrigeration. Following, the crowns were buccal-lingual sectioned into two-halves.

Adhesive formulation

Adhesive blends were formulated using the monomers 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA; Esstech Inc., Essington, PA, USA) and Bis-phenol A diglycidyl dimethacrylate (BisGMA; Esstech Inc., Essington, PA, USA) at ratio of 60/40 by weight. The photoinitiator system was composed by 0.4 wt% of dl-camphoroquinone (Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA), 0.8 wt% of a tertiary amine ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB; Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA), 0.01 wt% of inhibitor 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT, Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA) and 1wt% of diphenyliodonium hexafluorophosphate (DPIHFP, Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA). The blends were solubilized into 30 wt% of ethanol. An antibacterial monomer 2 (Methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride (MADQUAT; Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA) added to adhesive blends at 5 or 10 wt%, while adhesive without MADQUAT was used as control.

Brackets cementation

The enamel was acid etched with phosphoric acid at 34% (acid conditioner, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil) for 20 s. Afterwards, the acid was removed with water-stream by the same etching time and the enamel was air-dried. The adhesives were applied onto the etched enamel and light-cured by 20 s. Transbond XT composite resin (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) was applied to the base of the brackets (Ormco, Glendora, California, USA), which were hand-pressed to the center of the buccal face followed by cement excess removal. The cement was light-cured for 10 s in each side of the bracket, totalizing 40 s. All light-activations were performed using a LED-based light-curing unit Radian Cal (SDI, Bayswater, Victoria, Australia) with irradiance around 1100 mW/cm².

Cariogenic challenge

For each sample (tooth), one of the halves (lingual or buccal) was randomly allocated to cariogenic challenge, while the other was stored in distilled water for the same period. The samples allocated to cariogenic challenge were maintained in distilled water for 24 h after the cementation of brackets. Saliva was collected from a healthy volunteer who had not been under antibiotic therapy for at least 1 year. The volunteer abstained from oral hygiene for 24 hs and food for 2 h prior to collection of 20 mL of

saliva stimulated by paraffin film (Parafilm "M" ®, American National Can™, Chicago, Illinois, USA). The collected saliva was inserted into a sterile graduated tube and immediately homogenized in Vortex mixer (Biomixer QL-901, Biomol equipment and products for laboratories, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The samples (sterilized by gamma radiation at 4.08 KGy, Theratronics, Eldorado 78, Best Theratronic LTDA, Ottawa, ON, Canada) were placed in 24 wells-plates followed by inoculation of 400 µL of saliva. After 1 h, the saliva was removed from the bottom of the wells and replaced by 1.8 mL of defined medium enriched with mucin (DMM) containing 1 % sucrose. Then, the samples were incubated in anaerobic atmospheric condition (80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂) at 37 ° C. After 6 hours, the samples were dip-washed for 5s in sterile saline and inserted into new plates containing 1.8 ml of DMM without sucrose and incubated for 18 h at the same condition. The biofilms were cultivated for 5 days in this alternating sucrose regimen, and the medium was replaced twice per day (22).

Shear bond strength and failure mode

All samples were included in acrylic resin Class-Mold (Classic, São Paulo, SP, Brazil) cylinders to facilitate the handling. The cylinder were positioned on a shear device with the a knife-edged chisel placed at the enamel-bracket interface. A compressive load was applied at a 0.5 mm/min crosshead speed until failure of the bonding. Bond strength values were calculated in MPa considering the bracket base area. After the test, the teeth surfaces were observed in a stereomicroscope, at ×40 magnification, to determine the failure mode: Type I – No adhesive covering the enamel; Type II – less than 50% of adhesive covering the enamel; Type III – more than 50% of adhesive covering the enamel.

Hardness measurements

After the shear test, the tooth samples were longitudinally sectioned through their center with a water-cooled diamond saw. One half of the sample was embedded in poly(methyl methacrylate) and gently sequentially polished with 320-, 600-, 1200-, 1500-, and 2500-grit Sic sandpaper. Knoop hardness measurements were carried out using a micro-hardness tester HMV-2 (FM-700, Future Tech Corp, Tokyo, Japan) under load of 25 g and dwell time of 5 s. Two rows of eight indentations were made on each side of the specimen. The first row was performed in the center of enamel located below of bracket, while the other started on margin of the bonding interface. The indentations were made for both columns at depths of 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, and 200 µm from the surface of the specimen. The ΔS was calculated by subtracting the hardness profile in

the marginal readings obtained for those in the center (sound dentin), according to previous study (23).

Statistical analysis

Data analysis was performed using SigmaStat v.3.5 statistical software package (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Data from bond strength, ΔS under and around brackets were individually submitted to 2-way ANOVA, followed by *Tukey's* post hoc test. The effect of adhesive type and cariogenic challenge on failure mode proportion were evaluated by Chi-square test. The significance level was set at $\alpha = 0.05$ for all analyses.

Results

The results of bond strength and failure mode distribution are displayed at Table 1. The cariogenic challenge did not affect the bond strength ($p = 0.341$; for interaction, $p = 0.211$), however; the addition of ammonium based methacrylate to adhesive affected the results ($p = 0.006$). Using 10% of MADQUAT resulted in lowest values of bond strength, while no difference was observed between the concentration of 0 and 5%. The cariogenic challenge also did not alter significantly the distribution of failure mode (chi-square, $p = 0.090$). In opposite, the concentration of ammonium based methacrylate altered the distribution of failure mode (chi-square, $p = 0.008$), while using higher concentration resulted in highest amount of type I failure.

The results of demineralization measurements are presented at Table 2. Neither the adhesive type ($p = 0.959$) nor cariogenic challenge ($p = 0.759$; for interaction, $p = 0.963$) affected the demineralization under the orthodontic bracket. When the demineralization was evaluated around of bracket, both factors (adhesive type, $p = 0.006$; cariogenic challenge, $p < 0.001$) affected the values of demineralization, while an interaction between these factors was observed ($p = 0.006$). In absence of cariogenic challenge (control), no difference was observed between the different concentrations of MADQUAT. In opposite, adhesives containing 10% of MADQUAT resulted in lowest demineralization around the bracket, while no difference was observed between the other concentrations when the specimens were submitted to cariogenic challenge. Except for the concentration of 10%, the cariogenic challenge significantly increased the demineralization around the brackets. The alteration of hardness in function of depth when measured under and around of the brackets is illustrated at Figure 1. The figure 2

shows the profile of hardness in function of depth measured around the bracket for specimens submitted to cariogenic challenge.

Discussion

The caries lesions development remains as an undesirable effect of orthodontic treatment in several patients due to increased difficulty to remove biofilm around of the brackets. Thus, materials for bracket cementation with antibacterial potential and/or acting on re-mineralization of caries lesions have been developed. Despite be the best evidence, clinical trials are expensive and time consuming hindering the evaluation of novel materials. Furthermore, factors as exposition of fluorides, carbohydrates and those related to toothbrush are difficult to be controlled in clinical studies. Regarding *in-vitro* studies, models using complex multispecies biofilm from natural dental plaque or saliva are able to reproduce with more accuracy the caries process observed under clinical conditions. The microcosm model results in caries-like lesions and allows to control the extension of lesion depends on the incubation time (25,25).

In the present study, the biofilms were cultivated for 5 days producing a lesion in enamel with around 200 μm of depth when the adhesive control was used. As expected, the caries lesions were observed only at margin of cemented brackets with significant mineral loss of specimens submitted to cariogenic challenge. However, only the addition of 10% of MADQUAT reduced the mineral loss around the bracket. The reduction on caries lesion development can be attributed to antibacterial potential of MADQUAT, reducing the cariogenic activity of bacteria and/or biofilm adhesion to substrate. The antibacterial effect of quaternary ammonium monomers occurs when the negatively charged bacteria cells contact the positive quaternary amine charge (N^+), disturbing the electric balance and promoting rupture of bacterial membranes due to increased osmotic pressure, causing the bacteria lysis (26,27). Previous studies using Methacryloxyethyl cetyl dimethyl ammonium chloride (DMAE-CB), a quaternary ammonium-based monomer with molecular structure similar to antibacterial monomer used in the present study; demonstrated reduction on growing and accumulation of *Streptococcus mutans* by addition of 3% of that monomer to commercial available adhesive (28,29). However, in the present study, only the addition of 10% of MADQUAT was able to significantly reduce the mineral loss. It is important to emphasize that in those previous studies using

3% of DMAE-CB was effective against *Streptococcus mutans* when films of cured adhesives and their eluents were used, whereas the behavior of the adhesive applied over tooth substrate can be different. Differences on cariogenic biofilm models used (from monoculture or microcosm) can be also related to these dissimilar findings (McBain, 2009). Furthermore, differences on molecular structures between the monomers also can intervene on concentration required to achieve effective inhibition on caries lesions.

Despite the effectiveness on carious lesion inhibition, adhesives containing 10% of MADQUAT presented lowest values of bond strength to enamel irrespective the presence of cariogenic challenge. Moreover, the addition of MADQUAT significantly affected the failure mode in opposite to cariogenic challenge. The adhesive with 10% of MADQUAT presented the highest amount of type I, while no type III failure was found. There is a reduction on amount of adhesive covering the fractured surface from type I toward type III mode, indicating that less adhesive remains over the enamel when adhesive with 10% of MADQUAT was used. Poorer polymerized resin adhesive tends to leave to more cohesive failure than when a proper polymerization is achieved. Thus, it is can speculated that the addition of 10% of MADQUAT to adhesive resin can hindered its polymerization. One reasonable explanation is that the radical N^+ present in MADQUAT can interact with the photoinitiator system based on free radical generation through amine/camphoroquinone reaction and impairs the adhesive polymerization. Furthermore, MADQUAT is provided by manufacturer in an aqueous solution, increasing the amount of solvent in the adhesive resin and the likelihood of residual solvent impairs the adhesive polymerization. A prior study did not found reduction on bond strength of adhesive to dentin when the antibacterial monomer DMAE-CB was added to adhesive resin (30). However, it is important emphasize that DMAE-CB was added until 3%, whereas increased concentrations would enhance any possible deleterious effect of cationic monomer addition on adhesive polymerization.

The findings of present study also demonstrated that the cariogenic challenge did not alter the bond strength of bracket to enamel even in presence of mineral loss. The bonding interface to enamel is established by penetration of adhesive into spaces created by acid etching to produce a zone of inter-diffusion responsible by micro-mechanical retention of adhesive resin to tooth substrate. Thus, the bond strength produced is mainly affected by proper penetration and polymerization of adhesive *in-situ*; while the stability of bond interface depends on absence of significant modification on polymer formed or

tooth substrate. There is no evidence reporting any degradation of adhesive resin under cariogenic challenge, while no alteration on hardness occurs on enamel under that bracket, which is the substrate where the adhesive is bonded. However, in longer periods of cariogenic challenge, a significant reduction on bond strength to dentin was observed, which may be more related to degradation of the substratum than to the degradation of the adhesive resin (31). A feasible effect of carious lesion on bond strength values could be expected due to possible alterations on stress distribution during the shear loading by reduction on mechanical properties of enamel around of bracket. A recent study demonstrated that alterations on elastic modulus and hardness of caries-affected dentin did not significantly affect the stress distribution when cylinders of resin cements were submitted to shear loading (32). Despite the differences among the substrates analyzed and on characteristic of material receiving the loading, it could also be expected that the modification on enamel hardness surrounding the bracket no significantly affected the stress distribution during the bond strength test.

The results of present study demonstrated that the addition of quaternary ammonium MADQUAT to dental adhesives can be a viable strategy to hinder the development of carious lesions around of orthodontic brackets. Considering that these brackets are submitted to intermittent shear loading during the orthodontic treatment, the reduced bond strength observed when MADQUAT might favors a higher occurrence of bracket de-bonding. However, the reduced bond strength of adhesive containing 10% of MADQUAT when compared to adhesive control (around 21% lower) did not mean neither reduced stability of bonding interface under clinical conditions nor enhanced likelihood of de-bonding. It is difficult to determine a minimum value of bond strength necessary to support the load application during the orthodontic treatment. Furthermore, future studies submitting the bonding interface to other clinical challenges than cariogenic one are necessary to evaluate the stability of interface produced by adhesives containing MADQUAT.

References

1. Masoud MI, Allarakia R, Alamoudi NM, Nalliah R, Allareddy V. Long-term clinical and bacterial effects of xylitol on patients with fixed orthodontic appliances. *Progress in Orthodontics*. 2015. 16:35.
2. Passariello C, Sannino G, Petti S, Gigola P. Intensity and duration of in-vitro antibacterial activity of different adhesives used in orthodontics. *Eur J Oral Sci*. 2014.122(2):154-60.
3. Lucchese A, Gherlone E. Prevalence of white-spot lesions before and during orthodontic treatment with fixed appliances. *Eur J Orthod* 2013; 35:664-668.
4. Condò R, Casaglia A, Condò SG, Cerroni L. Plaque retention on elastomeric ligatures. An in vivo study. *Oral Implantol (Rome)*. 2013.5(4):92-9.
5. Ramazanzadeh B, Jahanbin A, Yaghoubi M, Shahtahmassbi N, Ghazvini K, Shakeri M, Shafae H. Comparison of Antibacterial Effects of ZnO and CuO Nanoparticles Coated Brackets against *Streptococcus Mutans*. *J Dent Shiraz UnivMed Sci*. 2015. 16(3): 200-205.
6. Oosterkamp BC, van der Sanden WJ, Frencken JE, Kuijpers-Jagtman AM. Caries preventive measures in orthodontic practice: the development of a clinical practice guideline. *Orthod Craniofac Res*. 2016.19(1):36-45..
7. Knösel M, Klang E, Helms HJ, Wiechmann D. Occurrence and severity of enamel decalcification adjacent to bracket bases and sub-bracket lesions during orthodontic treatment with two different lingual appliances. *European Journal of Orthodontics*. 2015. 1–8.
8. Borges FB, Kochhann DELEL, Machado FW, Boscato N, Van De Sande FH, Moraes RR, et al. Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. *J Appl Oral Sci*. 2014.22(1):68-72.
9. Shobbana Devi VR, Anand MK, Venkateswaran S, Iyer KS, Krishnaswamy NR. Comparison of shear bond strength of self-etching fluoride releasing adhesives with and without pumice prophylaxis. *Indian J Dent Res*. 2015.26(4):390-5
10. Duraisamy V, Xavier A, Nayak UA, Reddy V, Rao AP. An in vitro evaluation of the demineralization inhibitory effect of F(-) varnish and casein phosphopeptide-amorphous

calcium phosphate on enamel in young permanent teeth. J Pharm Bioallied Sci. 2015.7(Suppl 2):S513-7.

11. Pinto CF, Berger SB, Cavalli V, Da Cruz SE, Gonçalves RB, Ambrosano GM, Giannini M. In situ antimicrobial activity and inhibition of secondary caries of self-etching adhesives containing an antibacterial agent and/or fluoride. Am J Dent. 2015.28(3):167-73

12. Pinto CF, Paes-Leme AF, Ambrosano GMB, Giannini M. *In Vitro* Secondary Caries Inhibition by Adhesive Systems in Enamel Around Composite Restorations. Oper Dent. 2010.35(3): 345-352

13. Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RC, Magalhães AC, Palomari Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Control of white spot lesion adjacent to orthodontic bracket with use of fluoride varnish or chlorhexidine gel. ScientificWorldJournal. 2015.218452

14. Zhang N, Weir MD, Romberg E, Bai Y, Xu HHK. Development of novel dental adhesive with doublebenefits of protein-repellent and antibacterialcapabilities. Dental materials 31. 2015.845-854.

15. Pupo YM, Farago PV, Nadal JM, Simão LC, Esmerino LA, Gomes OMM, Gomes JC. Effect of a Novel Quaternary Ammonium Methacrylate Polymer (QAMP) on Adhesion and Antibacterial Properties of Dental Adhesives. Int. J. Mol. Sci. 2014. 15: 8998-9015.

16. Wang S, Zhang K, Zhou X, Xu N, Xu HHK, Weir MD, Ge Y, Wang S, Li M, Li Y, Xu X, Cheng L. Antibacterial Effect of Dental Adhesive Containing Dimethylaminododecyl Methacrylate on the Development of Streptococcus mutans Biofilm. Int. J. Mol. Sci. 2014. 15:12791-12806.

17. Centenaro CC, Rostirolla FV, Leitune VCB, Parolo CF, Ogliari FA, Samuel SMW, Collares FM. Influence of addition of 2-[3-(2h-benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl methacrylate to na experimental adhesive system. Acta Odontol Latinoam. 2015. 28(1): 72-78.

18. de Moraes AP, Barwaldt CK, Nunes TZ, Sarkis-Onofre R, Ogliari FA, Boscato N, et al. Effect of triazine derivative added to denture materials on a microcosm biofilm model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012.100(5):1328-33.

19. Stopiglia CD, Collares FM, Ogliari FA, Piva E, Fortes CB, Samuel SM, et al. Antimicrobial activity of [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride against *Candida* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2012.29(1):20-3.
20. Melo MA, Morais WA, Passos VF, Lima JP, Rodrigues LK. Fluoride releasing and enamel demineralization around orthodontic brackets by fluoride-releasing composite containing nanoparticles. *Clin Oral Investig.* 2014.18(4):1343-50.
21. Wong L, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001.46(6):477-86.
22. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011. 27(9):1057-63.
23. Sousa RP, Zanin ICJ, Lima JPM, Vasconcelos SMLC, Melo MAS, Beltrao HCP, Rodrigues LKA. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *J Dent.* 2009. 37(1):44-51.
24. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling.* 2011. 27(9):1057-63.
25. Maske TT, Isolan CP, van de Sande FH, Peixoto AC, Faria-E-Silva AL, Cenci MS, Moraes RR. A biofilm cariogenic challenge model for dentin demineralization and dentin bonding analysis.. *Clin Oral Investig.* 2015.19(5):1047-53.
26. Beyth N, Yudovin-Farber I, Bahir R, Domb AJ, Weiss EI. Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Biomaterials.* 2006. 27:3995–4002.
27. Xu X, Wang Y, Liao S, Wen ZT, Fan Y. Synthesis and characterization of antibacterial dental monomers and composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012. 100(4):1151-62.
28. Li F, Chai ZG, Sun MN, Wang F, Ma S, Zhang L, Fang M, Chen JH. Anti-biofilm effect of dental adhesive with cationic monomer. *J Dent Res.* 2009. 88(4):372-6.

29. Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, Ma S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent*. 2009. 37(4):289-96.
30. Xiao YH, Ma S, Chen JH, Chai ZG, Li F, Wang YJ. Antibacterial activity and bonding ability of an adhesive incorporating an antibacterial monomer DMAE-CB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009. 90(2):813-7.
31. Montagner AF, Pereira-Cenci T, Cenci MS. Influence of cariogenic challenge on bond strength stability of dentin. *Braz Dent J*. 2015. 26(2):128-34.
32. Peixoto AC, Bicalho AA, Isolan CP, Maske TT, Moraes RR, Cenci MS, Soares CJ, Faria-e-Silva AL. Bonding of Adhesive Luting Agents to Caries-affected Dentin Induced by a Microcosm Biofilm Model. *Oper Dent*. 2015. 40(3):E102-11.

Table 1. Results of shear bond strength and failure mode analysis.

Addition of ammonium based methacrylate	Bond strength (MPa)			Failure Mode (n)					
				Control			Cariogenic challenge		
	Control	Cariogenic challenge	Pooled average	Type I	Type II	Type III	Type I	Type II	Type III
0%	10.9 (2.8)	14.0 (3.8)	12.4 (3.6) ^A	0	5	5	4	4	2
5%	13.3 (3.6)	13.7 (3.4)	13.5 (3.4) ^A	2	5	3	3	7	0
10%	10.2 (3.0)	9.4 (4.4)	9.8 (3.7) ^B	6	4	0	6	4	0

For pooled average, distinct letters indicate statistical difference ($p < 0.05$).

Type I – No adhesive over the enamel; Type II – less than 50% of adhesive over the enamel; Type III – more than 50% of adhesive over the enamel.

Table 2. Means (standard deviation) of Demineralization (ΔS).

Addition of ammonium based methacrylate	Local of hardness measurement			
	Under bracket		Around of bracket	
	Control	Cariogenic challenge	Control	Cariogenic challenge
0%	1,446.9 (900.1)	1,286.2 (830.2)	1,580.1 (827.0) ^{Ba}	9,823.1 (4,138.3) ^{Aa}
5%	1,401.5 (1455.7)	1,428.9 (1,135.9)	1,626.6 (1,078.3) ^{Ba}	7,876.5 (3,969.1) ^{Aa}
10%	1,383.1 (1,299.6)	1,215.0 (936.1)	1,582.0 (862.0) ^{Aa}	3,932.5 (1,817.2) ^{Ab}

Distinct letters (lowercase for column, uppercase for line) indicate statistical difference ($p < 0.05$).

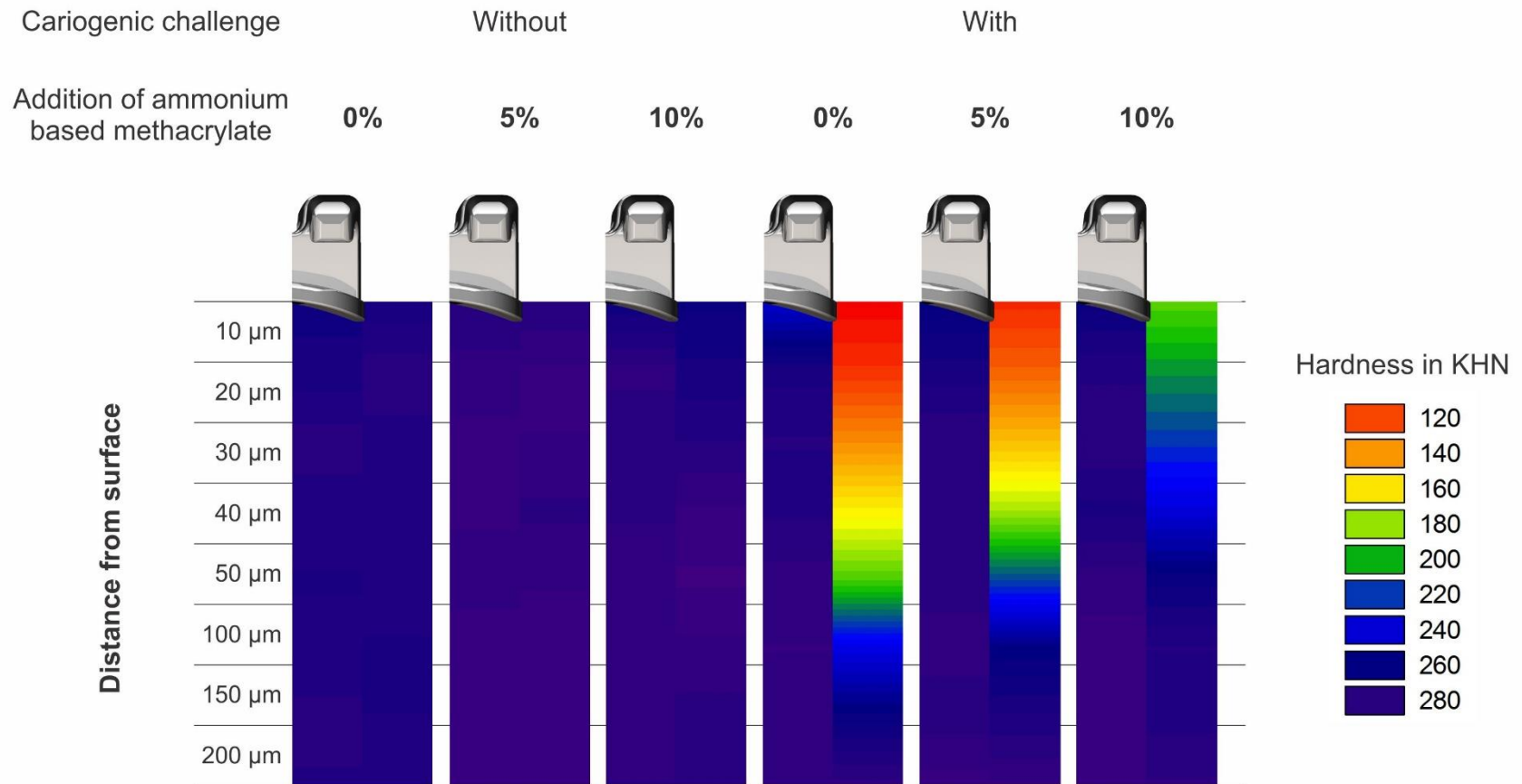


Figure 1. Hardness measured in each depth of specimens.

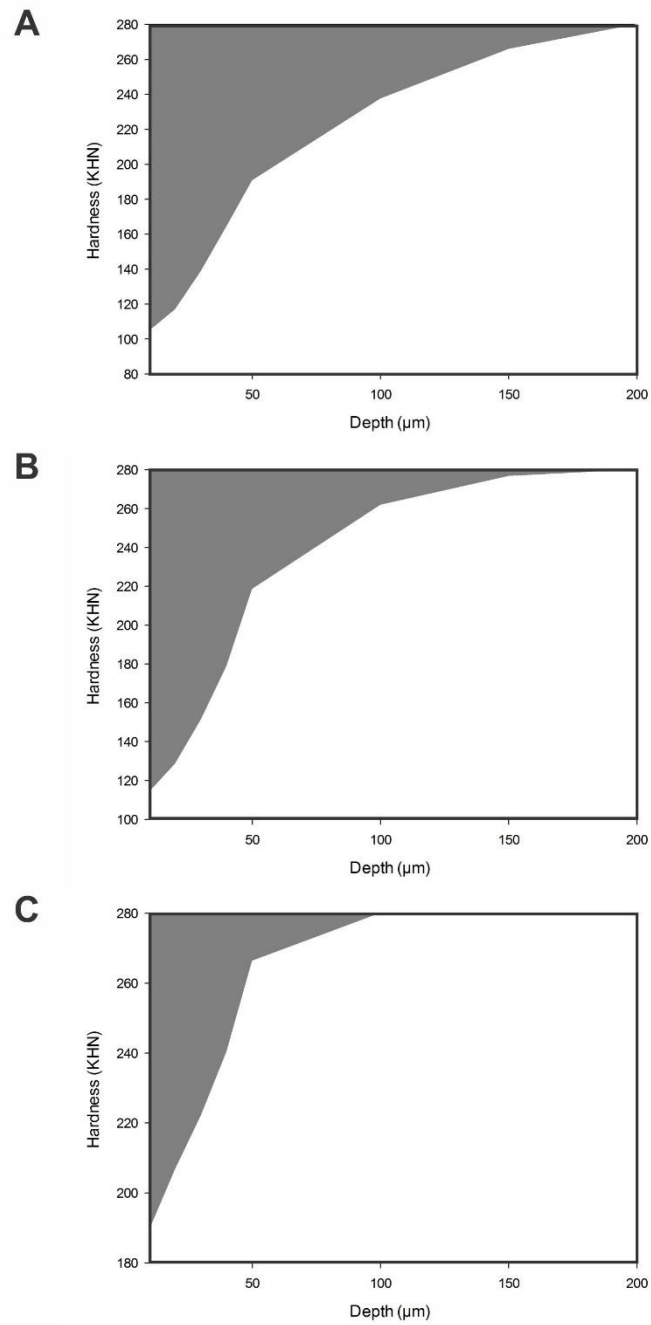


Figure 2. Profile of hardness by depth of specimens submitted to cariogenic challenge. a) 0% of ammonium based methacrylate; b) 5% of ammonium based methacrylate and c) 10% of ammonium based methacrylate.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro das limitações de um estudo in vitro, o adesivo experimental contendo o monômero quaternário de amônio a concentração de 10% em peso foi eficaz na redução da perda mineral integrada, apesar da redução na resistência de união. Contudo, essa redução da união não necessariamente indica um aumento na possibilidade de descolagem do bráquete quando aplicada uma força ortodôntica. Além disto, a estabilidade da interface de união produzida por adesivos é afetado por outros fatores. Assim, estudos futuros que submetam a interface de união entre o esmalte dental e o bráquete a outros desafios clínicos, além do cariogênico, são necessários para avaliar a estabilidade e longevidade da interface produzida por adesivos contendo compostos quaternários de amônio.

6 COMUNICADO DE IMPRESSA (PRESS RELEASE)

Adição de monômero com função quaternária de amônio em adesivos experimentais para colagem de bráquetes metálicos: desenvolvimento de lesão cáriosa e resistência de união após desafio cariogênico

A busca pelo alinhamento perfeito dos dentes tem aumentado o número de pacientes de todas as idades que buscam pelo tratamento ortodôntico. Entretanto, um dos efeitos colaterais mais frequente durante e/ou após o tratamento é o surgimento de lesões incipientes de cárie manifestada por manchas branca. Isto ocorre porque, além da maior dificuldade de higienização relatada pelos pacientes usando aparelho ortodôntico, o desenho componentes do aparelho fixo favorecem a retenção e acúmulo de biofilme (colônia de bactérias). Estudos clínicos mostram que mais de 85% dos pacientes apresentam risco aumentado de desenvolvimento de cárie durante o tratamento durante o uso de aparelhos fixos. Considerando que a manutenção da saúde dental é fundamental para o sucesso do tratamento ortodôntico, as pesquisas têm focado no desenvolvimento de materiais dentários com potencial antibacteriano. O uso de sistemas adesivos (usado para fixar o bráquete ao dente) contendo componentes resinosos capazes de inibir a atividade e crescimento bacteriano tem demonstrado potencial para reduzir a ocorrência de cáries próximo a bráquetes, destacando-se os monômeros com função quaternária de amônio (tipo de ligação química). Assim, pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, em parceria com a Universidade Federal de Pelota/ RS, desenvolveram adesivos experimentais incorporando um destes monômeros e submeteram dentes com bráquetes a desafio simulado de cárie. Além da inibição da lesão de cária, foi avaliado também a os efeitos destes compostos na retenção do bráquete ao elemento dental. Esta pesquisa foi a dissertação de Mestrado da cirurgiã-dentista Patrícia Layane de Menezes Macêdo Nascimento, orientada pelo Prof. Dr. André Luís Faria-e-Silva. Os resultados mostraram que a adição do antimicrobiano testado ao adesivo usado na colagem do braquete foi eficaz para reduzir a desmineralização, quando usado em uma concentração de 10%. Entretanto, uma redução na retenção do bráquete ao dente também foi observado.

REFERÊNCIAS

1. Hosseini MH, Namvar F, Chalipa J, Saber K, Chiniforush N, Sarmadi S, et al. Comparison of Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets Bonded to Enamel Prepared By Er:YAG Laser and Conventional Acid-Etching. *J Dent (Tehran)* 2012;**9**(1):20-6.
2. Melo MA, Morais WA, Passos VF, Lima JP, Rodrigues LK. Fluoride releasing and enamel demineralization around orthodontic brackets by fluoride-releasing composite containing nanoparticles. *Clin Oral Investig* 2014;**18**(4):1343-50.
3. Borges FB, Kochhann DELEL, Machado FW, Boscato N, Van De Sande FH, Moraes RR, et al. Effect of cariogenic challenge on the stability of dentin bonds. *J Appl Oral Sci* 2014;**22**(1):68-72.
4. Passariello C, Sannino G, Petti S, Gigola P. Intensity and duration of in-vitro antibacterial activity of different adhesives used in orthodontics. *Eur J Oral Sci* 2014;**122**(2):154-60.
5. Zhang K, Cheng L, Imazato S, Antonucci JM, Lin NJ, Lin-Gibson S, et al. Effects of dual antibacterial agents MDPB and nano-silver in primer on microcosm biofilm, cytotoxicity and dentine bond properties. *J Dent* 2013;**41**(5):464-74.
6. Zhang K, Li F, Imazato S, Cheng L, Liu H, Arola DD, et al. Dual antibacterial agents of nano-silver and 12-methacryloyloxydodecylpyridinium bromide in dental adhesive to inhibit caries. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013;**101**(6):929-38.
7. Fan C, Chu L, Rawls HR, Norling BK, Cardenas HL, Whang K. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. *Dent Mater* 2011;**27**(4):322-8.
8. Li F, Weir MD, Chen J, Xu HH. Effect of charge density of bonding agent containing a new quaternary ammonium methacrylate on antibacterial and bonding properties. *Dent Mater* 2014;**30**(4):433-41.
9. de Moraes AP, Barwaldt CK, Nunes TZ, Sarkis-Onofre R, Ogliari FA, Boscato N, et al. Effect of triazine derivative added to denture materials on a microcosm biofilm model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012;**100**(5):1328-33.
10. Stopiglia CD, Collares FM, Ogliari FA, Piva E, Fortes CB, Samuel SM, et al. Antimicrobial activity of [2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride against *Candida* spp. *Rev Iberoam Micol* 2012;**29**(1):20-3.

11. van de Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose-response studies. *Biofouling* 2011;**27**(9):1057-63.
12. Wong L, Sissons C. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;**46**(6):477-86.
13. ARTUN, J.; BERGLAND, S. Clinical trials with crystal growth conditioning as an alternative to acid-etch enamel pretreatment. *Am J Orthod*, St. Louis. 1984. v. 85, no. 4, p. 333 – 340.
14. Sousa RP, Zanin ICJ, Lima JPM, Vasconcelos SMLC, Melo MAS, Beltrao HCP, Rodrigues LKA. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *Journal of dentistry* 37. 2009. 44 – 51.

ANEXO A

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Adição de monômeros com função quaternária de amônio em adesivos experimentais para colagem de bráquetes metálicos: desenvolvimento de lesão cariosa e resistência de união após desafio cariogênico

Pesquisador: Patrícia Layane de Menezes Macêdo Nascimento

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43229115.1.0000.5546

Instituição Proponente: Universidade Federal de Sergipe - Campus Lagarto - Núcleo de

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.110.474

Data da Relatoria: 12/06/2015

Apresentação do Projeto:

O Projeto se destina a uma dissertação de Mestrado em Odontologia na UFS. Pretende estudar o efeito da incorporação de monômero funcional quaternário de amônio, em diferentes concentrações, no desenvolvimento de lesões cariosas próximas à interface e na resistência de união de bráquetes ao esmalte dental.

Objetivo da Pesquisa:

-Avaliar o efeito da adição de derivados de compostos quaternários de amônio a adesivos experimentais, utilizados na cimentação de bráquetes ortodônticos, sobre a resistência de união destes bráquetes, antes e após desafio cariogênico, e no desenvolvimento de lesões cariosas ao redor da cimentação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco é mínimo, de desconforto em disponibilizar o tempo para a coleta da saliva; atenuado pela oferta do benefício direto para o doador de uma avaliação odontológica. O benefício indireto é a contribuição para o controle da cárie, e para o desenvolvimento da área de biomateriais do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFS.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

Continuação do Parecer: 1.110.474

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma Pesquisa relevante, com um estudo fatorial, envolvendo dois fatores "sistema adesivo", em 3 níveis, e "desafio cariogênico", em 2 níveis, cujas variáveis resposta serão a resistência de união ao teste de cisalhamento, e os valores de dureza do tecido dental próximo a interface de união. Serão utilizados trinta premolares humanos, e para avaliação da eficácia das substâncias antimicrobianas nos materiais adesivos, se utilizará métodos de Indução de cárie com modelos de biofilme através de culturas originadas a partir de microcosmos com a saliva humana. Os dados de resistência de união serão submetidos à Análise de Variância, de duas vias com medidas repetidas, sendo o fator em estudo o sistema adesivo e a repetição a Indução ou não de cárie, seguida pelo teste de Tukey. Os dados de padrão de falha serão submetidos ao teste de Qui-quadrado para os fatores: adesivo e Indução de cárie.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem considerações.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Cláudio Beliste s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1835

E-mail: cephu@ufes.br

ANEXO B

Universidade Federal de Sergipe
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título do projeto: "ADIÇÃO DE MONOMEROS COM FUNÇÃO QUATERNARIA DE AMONIO EM ADESIVOS EXPERIMENTAIS PARA COLAGEM DE BRAQUETES METALICOS: DESENVOLVIMENTO DE LESAO CARIOSA E RESISTENCIA DE UNIAO APOS DESAFIO CARIOGENICO"

Pesquisadora responsável pelo estudo: **Patrícia Layane de Menezes Macêdo Nascimento**

Telefones para Contato: (79) 3249-3261 / (79) 8807-8342

Nos procedimentos de colagem de aparelhos ortodônticos usando adesivos convencionais, muitas vezes, observamos insucesso devido ao surgimento de manchas brancas e posterior lesões de cárie. Isso ocorre devido ao acúmulo de biofilme e à dificuldade de higienização. A utilização de sistemas de união que liberem agentes antimicrobianos para as áreas onde estão posicionados os bráquetes pode auxiliar na redução das cáries, contribuindo para o sucesso do tratamento ortodôntico e a manutenção da saúde do dente. Por isso, propusemos nesta pesquisa adicionar substâncias com ação antimicrobiana para realizar a colagem entre o aparelho fixo e o dente e avaliar seus efeitos no desenvolvimento da mancha branca de cárie e a resistência dessa união. Para a realização deste experimento em laboratório (in vitro) será necessário induzir a formação de cárie através de um meio enriquecido (DMM) contendo saliva humana, íons, mucina, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento. A saliva será coletada de um doador voluntário saudável, que não recebeu terapia antibiótica por pelo menos 1 ano e se absteve de higiene oral por 24 horas, bem como de alimentação 2 horas previamente à coleta de 20 ml. de saliva estimulada por filme de parafina. O doador irá expelir a saliva dentro de um tubo graduado no qual serão adicionados posteriormente o meio enriquecido (DMM). Esta coleta não oferecerá riscos para saúde do doador, apenas o desconforto da disponibilidade de tempo para a coleta da saliva. Este incômodo mínimo será atenuado pela oferta de benefício para o doador de uma avaliação odontológica e a contribuição que este doador faz para o controle de cárie.

Por este instrumento que atende as exigências legais, o (a) senhor (a) _____, após minuciosa e detalhada explicação pelos pesquisadores envolvidos neste estudo, ciente de que os procedimentos aos quais será submetido (a) restringem-se ao protocolo de doação de saliva, não restando dúvidas a respeito do explicado, firma CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância a participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu consentimento livre e esclarecido, sem qualquer prejuízo, deixando de participar do estudo alvo da pesquisa e estando ciente que todo trabalho realizado se torna informação confidencial guardada por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

_____, _____ de _____ de 2015

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador